

# Ersatzmethode für den Maus/Ratte Antikörper Produktions Test Sensitivitätsvergleich zwischen *in vitro* und *in vivo* Methode

Frank Bootz und Isabella Sieber

Institut für Labortierkunde Universität CH-Zürich

## Zusammenfassung

*Der Maus oder Ratte Antikörper Produktions (MAP/RAP) Test wird in der mikrobiologischen Diagnostik eingesetzt, um biologische Materialien wie Tumoren, Zelllinien, Seren, Implantate usw. auf das Vorhandensein von Mikroorganismen zu testen. In dieser Studie wurden speziell die nagerpathogenen Viren untersucht.*

*Mit den molekularbiologischen Methoden der Polymerase Kettenreaktion (PCR) und des quantitativen Realtime PCR stehen heute Technologien zur Verfügung, die im Stande sind, Mikroorganismen aus den oben genannten Geweben ohne den Einsatz von Tieren nachzuweisen.*

*Die konventionelle PCR und die quantitative Realtime PCR des TaqMan® als Ersatzmethoden zum bisher verwendeten MAP-Test (serologischer Nachweis), wurden hinsichtlich ihrer Sensitivität miteinander verglichen.*

*Bei der Bestimmung der Nachweisgrenze von MAP-Test, konventionellem PCR und TaqMan® wurden identische Virusverdünnungen von 14 Viren mit allen drei Methoden gemessen. In 2/14 Fällen waren alle drei Nachweismethoden gleich sensitiv, bei 6/14 Viren die konventionelle PCR sensitiver als der MAP-Test und in 12/14 Fällen war der Realtime PCR sensitiver als der MAP-Test.*

Summary: Replacement of mouse and rat antibody production test

Validation of different polymerase chain reaction assays  
*Bacteria and viruses may be transmitted through contaminated biological materials such as transplantable tumors, cell lines, sera or other biological material.*

*Currently, the screening of biological material is being done using the mouse or rat antibody production (MAP/RAP) test (serological testing).*

*We decided to test and validate an alternative assay using polymerase chain reaction (PCR / RT-PCR) technology to detect viral contamination directly in biological material.*

*The aim of this study therefore is the validation of our new PCR assays and the comparison of PCR and MAP test.*

*For 6/14 viruses the conventional PCR seems to be more sensitive and more specific in detecting murine viruses. In 12/14 viruses the RT-PCR is more sensitive than the MAP-test. In 2/14 cases all detection methods have the same sensitivity. Furthermore, PCR screening clearly contributes to the principles of 3R as a replacement technique as it eliminates the need for using animals to screen for murine viruses in biological material.*

Keywords: MAP/RAP test, PCR, replacement technique, murine viruses, biological material, 3R

## 1 Einleitung

In sehr unterschiedlichen Bereichen, von der Chargenüberprüfung bei Implantaten bis zur Überprüfung der in Tierversuchen eingesetzten biologischen Materialien, wird der MAP/RAP Test in der Diagnostik eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wird ausschliesslich auf die Diagnostik von nagerpathogenen Keimen in Versuchstierhaltungen eingegangen.

Als Grundlage zur Vermeidung und Begrenzung von Tierversuchen dient immer noch das Postulat von Russel und Burch (1959) *Replace, Reduce, Refine*

(3R). Um Tierversuche optimieren und reduzieren zu können, müssen sie standardisiert werden. Nur standardisierte Parameter geben uns die Möglichkeit, unterschiedliche Studien zu vergleichen. Nur bei einer standardisierten Population kann die individuelle Streuung der Versuchsergebnisse klein gehalten und dadurch die aus statistischen Gründen benötigte Tierzahl reduziert werden. Der Gesundheitsstatus der Versuchstiere spielt dabei eine sehr bedeutende Rolle.

Für Versuchszwecke verwendete biologische Materialien wie Seren, Tumorgewebe, Zellkulturen und weitere trans-

plantable Gewebe müssen häufig, versuchsbedingt, in Labornager appliziert werden. Diese biologischen Materialien können Träger einer Vielzahl von unerwünschten Mikroorganismen sein. Eine mikrobielle Kontamination hat nicht nur eine höhere Streuung der Versuchsergebnisse zur Folge, sondern kann vor allem bei immunologischen Studien und in der Onkogenese zu verfälschten Resultaten führen.

So können das Laktatdehydrogenase Virus (LDV) (Isakov, 1981) und das Mäusehepatitisvirus (MHV) (Kyriazis, 1979) das Tumorwachstum beeinflussen.

Parvoviren wie MVM (Engers, 1981) und das Mäusehepatitisvirus (Dempsey, 1986) beeinflussen das Immunsystem, wie auch alle anderen viralen Erreger.

Bevor biologische Materialien wie Transplantationstumore, Zelllinien u.a. in einen Tierbestand eingebracht werden, sollten sie auf virale, bakterielle und parasitäre Kontaminanten überprüft werden. Diese Kontrolle wurde für Viren, teilweise auch für Mykoplasmen und Bakterien, bisher mit Hilfe des MAP-Testes durchgeführt. Dieser Test wurde erstmals 1959 für das Polyomavirus entwickelt (Rowe, 1959). Später wurde dieser Test auf andere murine Viren ausgeweitet (Hartley, 1960; Parker, 1968; Vester, 1970). Dabei wird das fragliche biologische Material homogenisiert und SPF-Mäusen (spezifiziert pathogenfrei) i.p. (*intraperitoneal*) und i.n. (*intranasal*) appliziert. Nach 28-30 Tagen werden die Mäuse euthanasiert und ihr Serum hinsichtlich der virusspezifischen AK untersucht. In der Vergangenheit hat die Überprüfung unterschiedlichster biologischer Materialien gezeigt, dass sehr viele Seren, Knochenmark, Transplantationstumore etc. mit Viren kontaminiert sind. In verschiedenen Studien wurden Transplantationstumore und Zelllinien auf mikrobielle Kontaminanten untersucht. Dabei haben Collins und Parker (1972), Nicklas et al. (1993) und Nakai et al. (2000) das Vorkommen der einzelnen Viren und Bakterien beschrieben.

Es gilt dabei zu beachten, dass der MAP-Test nicht standardisiert ist. So sind die Tierzahlen, welche eingesetzt werden, individuell wählbar. Auch die Versuchsdauer variiert zwischen 21-30 Tagen. Zusätzlich gibt es Unterschiede zwischen den Injektionsvolumina des homogenisierten Gewebes mit einer daraus resultierenden Differenz zwischen den applizierten Konzentrationen. Somit ist die Vergleichbarkeit der einzelnen MAP-Tests und die Sicherheit deren Resultate nicht gegeben. Angaben über die Anzahl der im deutschsprachigen Raum jährlich durchgeführten MAP/RAP-Tests sind nicht erfasst. Lediglich im Bereich der Versuchstierhaltungen kann von jährlich 200-300 Tests, mit zunehmender Tendenz, ausgegangen werden.

Um eine Ersatzmethode zu diesem Tierversuch anbieten zu können, wurden

**Tab.1: Bezeichnung und Herkunft der zur Virusanzüchtung und Virustitration eingesetzten Zelllinien.**

Zelllinie	ATCC-Nr.	Gewebe
L929	CCL-1	Mausfibroblasten
BHK-21	CCL-10	Hamster-Nierenfibroblasten
HeLa	CCL-2	Human-Cervixadenocarcinom
MA-104	CRL-2378	Affennierenzellen
LLC-MK2	CCL-7. 1	Affennierenzellen
MEF	CRL-9292	Mausembryofibroblasten

in den letzten Jahren verschiedene Ansätze entworfen. Mit der zunehmenden Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in der Diagnostik steht eine vielversprechende molekularbiologische Technologie zur Verfügung, welche mit ihrer ausreichend hohen Sensitivität und Spezifität (Sermswan, 2000), die erhoffte Alternative zum MAP-Test darstellen könnte. In zwei Vorgängerarbeiten wurden PCR Assays für die wichtigsten 15 murinen Viren entwickelt (Tischhauser, 1999, Popovic 1998). Da bei diesen Arbeiten die genauen Viruskonzentrationen nicht bekannt waren, konnte keine Aussage über die jeweilige Sensitivität der Vergleichsmethoden getroffen werden. Diese für den Vergleich des Tierversuchs und der Ersatzmethode wichtige Beurteilung soll in dieser Arbeit nachgereicht werden. Es wurden 14 (Tab. 2) von den 15 in den oben beschriebenen Arbeiten von Tischhauser und Popovic eingesetzten, murinen Viren angezüchtet. Auf die Vermehrung des Hantavirus musste verzichtet werden, da es sich dabei um ein humanpathogenes Virus handelt, dessen Bearbeitung das Vorhandensein eines Biosicherheitsstufe 3 Labors bedarf.

Der Sensitivitätsvergleich dieser Testmethoden nach Herstellung genau definierter Viruskonzentrationen in einer reproduzierbaren Form war das Ziel dieser Arbeit. Um dies zu erreichen wurde ein Vergleich zwischen MAP-Test, konventioneller PCR und *Realtime*-PCR (TaqMan<sup>®</sup>) durchgeführt.

## 2 Tiere, Material und Methodik

### 2.1 Zelllinien

Die verschiedenen Zelllinien wurden vom Institut für Labortierkunde (Univer-

sität, CH-Zürich) und vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ, D-Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Ursprünglich wurden die Zelllinien von der ATCC (*American Type Culture Collection*), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA, bezogen.

### 2.2 Viren

Die verschiedenen RNA und DNA-Viren wurden vom Institut für Labortierkunde, dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ, D-Heidelberg), Prof. Kraft (BioDoc, D-Hannover) und Prof. Zinkernagel (Universität, CH-Zürich) zur Verfügung gestellt.

### 2.3 Tumorgewebe

Das Tumormaterial wurde von Prof. Dario Neri, Institut für Pharmazie der ETH-Zürich zur Verfügung gestellt. Es handelte sich dabei um das Colocarzinom C 51 (Corbett, 1975).

### 2.4 Extraktionskit

Für DNA-Viren wurde der DNeasy<sup>®</sup> Tissue Kit und für RNA-Viren der RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit von Qiagen (CH-4052 Basel) verwandt. Es wurden dabei 20-25mg Tumorgewebe gemeinsam mit 10 µl Virusmaterial mechanisch homogenisiert.

### 2.5 Anzucht der Zelllinien

Es wurden 6 verschiedene Zelllinien (Tab.1) angezüchtet. Die Aussaat erfolgte in einer Dichte von 500.000 Zellen/75cm<sup>2</sup> Flask (*Corning GmbH; Life Sciences; D-Wiesbaden*). Für die Zellzählung (Neubauer-Zählkammer) wurde in einem Eppendorf Röhrchen eine Zellsuspension aus 725 µl PBS-A, 25 µl Zellen in Lösung sowie 250 µl Trypanblau-Gebrauchslösung (Gibco BRL) hergestellt.



**Tab. 2: Bezeichnung und Herkunft der in unserer Studie eingesetzten Viren**

Virus	ATCC-Nummer	Familie
Ektromelle	VR-1374	Orthopoxvirus, DNA
K-Virus	VR-237	Papovavirus, DNA
Mad FL	VR-550	Adenovirus, DNA
MCMV	VR-1399	Herpesvirus, DNA
MVM	VR-1346	Parvovirus, DNA
Polyoma	VR-252	Papovavirus, DNA
LCMV/WE	Prof. Zinkernagel	Arenavirus, RNA
LDV	Prof. Zinkernagel	Togavirus, RNA
MHV-3	Prof. Kraft	Coronavirus, RNA
PVM	VR-25	Paramyxovirus, RNA
Reo 3	VR-824	Reovirus, RNA
Rota	DKFZ	Reovirus, RNA
Sendai	VR-105	Paramyxovirus, RNA
TMEV	VR-955	Picornavirus, RNA

Gesamtzellzahl in 10 Quadraten x 4 x 10<sup>4</sup> = Y Zellen/ml Zellsuspension.

Die Zellkulturflaschen wurden danach mit 15ml WM (Wachstumsmedium) aufgefüllt. Je nach Zelllinie wurde DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) oder MEM (*Minimal Essential Medium-Earles & L-Glutamin*) verwandt, wobei noch 10% fetales Kälberserum (BioConcept, CH-Allschwil) dazu gegeben wurde. Nach ungefähr 3-4 Tagen konnte eine Konfluenz der Zellen unter dem Lichtmikroskop erkannt werden. Darauf erfolgte die Subkultivierung der Zellen.

**2.6 Virenanzüchtung**

Bei der Virusanzüchtung wurde eine Zellkulturflasche 75cm<sup>2</sup> mit 2 Millionen Zellen, die für die Vermehrung der Viren geeignet waren, bestückt und mit WM auf 20 ml aufgefüllt. Nach 5-stündiger Inkubation hafteten die Zellen an der Flaskwand und das Medium wurde abgegossen. 1 ml 1:10 verdünntes Virusmaterial wurde dazugegeben (90 µl Erhaltungsmedium EM und 10 µl Virus). Diese Flüssigkeit wurde über die Zellen gleichmässig verteilt und eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Zellkulturflasche mit 15 ml EM (nur 2% FCS anstatt 10%, um das Wachstum der Zellen zu reduzieren und somit ihre Überwucherung zu verhindern) aufgefüllt und bis zum Auftreten eines zytopathischen Effektes inkubiert (Tab. 3). Nachdem gut 80% der Zellen zerstört waren, wurde die

Zellkulturflasche dreimal gefroren und anschliessend aufgetaut. Somit wurden alle Zellwände zerstört und die darin enthaltenen Viruspartikel frei. Danach wurde die Flüssigkeit abpipettiert und 15 Min. bei 1549 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, gut durchmischt aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Von diesen Aliquots wurde später eine Virustiterbestimmung durchgeführt.

**2.7 Virustiterbestimmung  
Titerbestimmung nach Kärber**

Es wurde die kulturinfektiöse Dosis 50 (=KID50=TCID50; *tissue culture in-*

*fectious dose* 50) durch die Endpunktverdünnungsmethode als Titer herangezogen. Die exakte Berechnung des Virustiters erfolgte nach der Formel von Kärber.

Log KID50 = L1,0-Lint(S-0,5)

L1,0 = Logarithmus der höchsten Verdünnungsstufe mit der Reaktionsrate R=1,0

Lint = Logarithmus des Verdünnungsintervalles (bei Zehnerverdünnungen: 1,0)

S = Summe der Reaktionsraten

0,5 = Konstante

Bei PVM und K-Virus wurde anstelle dieser Virustiterbestimmung ein Hämagglutinationstest vorgenommen. Wobei bei PVM Mauserythrozyten und bei K-Virus Hunderythrozyten verwendet wurden.

**Titerbestimmung mittels  
Hämagglutinationstest**

Auswertung des Ergebnisses: Knopfbildung (= keine Agglutination) oder Bodenhäutchen (= Agglutination). Eine HA-Einheit ist dabei die höchste Virusverdünnung mit einwandfrei sichtbarem Bodenhäutchen.

**Titerbestimmung für LDV**

Das LDV wurde 2 Mäusen *i.p.* injiziert und passagiert. Nach 24 Std. wurden die

**Tab. 3: Die maximale Viruskonzentration in der Zellkultur wurde durch den zytopathischen Effekt bei der Virusanzüchtung angezeigt. K-Virus, Sendai und LDV können nur *in vivo* vermehrt werden.**

Virus	Zelllinie	zytopathischer Effekt
Mad FL	L 929	nach 3 Tagen
MVM	L 929	nach 7 Tagen
TMEV	BHK-21	nach 1 Tag
Reo 3	BHK-21	nach 5 Tagen
MHV-3	L 929	über Nacht
Polyoma	MEF	nach 10 Tagen
MCMV	MEF	nach 6 Tagen
EDIM	MA-104	über Nacht
Ektromelia	HeLa	nach 3 Tagen
K-Virus	in Mäusen pass.	
PVM	BHK-21	nach 7 Tagen
Sendai	Hühnerembryo	
LDV	in Mäusen pass.	
LCMV	L 929	nach 4 Tagen

**Tab. 4: Forward und Reverse Primer der konventionellen PCR, unter "RT" sind die Primer für die reverse Transkription (RT) der RNA-Viren aufgeführt**

Virus	Forward Primer 5'-3'	Reverse Primer 5'-3'	RT
Mad FL	TACATGCACATCGCCGG	CCGCGGATGTCAAA	
Reovirus 3	TGCAAAGATGGGGAACGC	TGGTGACACTGACAGCAC	F' Pr.
Ektromelie	TGACTGAATACGACGAC	TGGATCTAATTGCGCATG	
MHV-3	AATGGAACCTTCTCGTTGGG	TAGTGGCTGTTAGTGTATGG	R' Pr.
Polyoma	ATGTGCACAGCGTGTA	TGTCATCGGGCTCAGC	
MCMV	ACAGTAAGCGATACGTGACCAC	GATGTAGTCCTTGAGCACGTCG	
PVM	TCCGAGGCATGATGCACCAG	CTTGCTTCTGAGCATATTCG	F' Pr.
K-Virus	GCTGGGAATATCAGGGAC	CGCTTTGTAAGGGAGATGGC	
Sendai	TGTTAGATGTGAACCAGC	TAGCTCTGTCAACACATG	F' Pr.
Rota	GTATGGTATTGAATATAC	ACTTGCCACCATTITTTTC	F' Pr.
LDV	AGTGCCTTGCTTCGCAATGC	GCTGAGTCGCTGCATCTGAC	R' Pr.
TMEV	CCTATTTGCACAGCCGT	GGAGAGGTGCCATAGTAGC	F' Pr.
LCMV	CGCACCGGGGATCCTAGGCT	CCTGTCCAGCCCAGCCAC	R' Pr.
MVM	GAGCGCCATCTAGTGAGC	ATTTGCCTGTGCTGGCTG	
Hanta	GGACAGACAGCAGACTGG	TCAGGATCCATATCATC	R' Pr.

Mäuse mit CO<sub>2</sub> euthanasiert und das Plasma gewonnen. Da der quantitative Nachweis von LDV äusserst kompliziert und zeitaufwendig ist, haben wir uns auf eine Arbeit von Maries van den Broek (1997) berufen. Demnach liegt nach einer 24-stündigen Passage in Mäusen ein Titer von 10(10) ID<sub>50</sub>/ml Plasma vor. Da wir Virusmaterial aus dieser Studie zur Verfügung hatten, haben wir diesen Wert als Basis angesetzt.

#### MAP-Test

Es wurden je Virus n=8 Mäuse mit 1ml Virussuspension *i.p.* und 20 µl *i.n.* infiziert. Das Virusmaterial wurde mit NaCl titriert. Es wurden 4 verschiedene Verdünnungen in jeweils n=2 Mäuse injiziert. Des Weiteren wurden n=10 Mäuse als Kontrollgruppe ausschließlich mit NaCl *i.p.* und *i.n.* injiziert. Nach 30 Tagen wurden die Mäuse unter CO<sub>2</sub> euthanasiert und mittels Herzpunktion ausgeblutet. Die Serumproben wurden von MicroBios GmbH (CH-Münchenstein) und/oder BioDoc-Hannover (D-Hannover) serologisch untersucht.

#### 2.8 PCR Allgemein

Bei der Polymerase Kettenreaktion werden geringste Mengen DNA vervielfältigt und später mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht. Die dazu benötigten *Primer* (Tab. 4) wurden aus den Vorläuferarbeiten von

Tischhauser und Popovic übernommen.

Um optimale Vergleichswerte zu bekommen, wurden die verschiedenen Virusverdünnungen 1 h mit Tumormaterial (Colocarzinom C51) inkubiert und später extrahiert. Damit sollten die natürlichen Bedingungen imitiert werden. Bei den RNA-Viren wurde die Inkubation mit dem Tumormaterial auf 5 Min. reduziert, da diese sehr schnell durch RNasen abgebaut werden können. Die Extraktion erfolgte je nach Virustyp mittels RNeasy<sup>®</sup>, Mini Kit oder DNeasy<sup>®</sup> Tissue Kit von Qiagen. Es wurden 25 mg Tumormaterial mit 10 µl Virus versetzt. Hierzu wurde identisches Virusmaterial wie schon für den MAP-Test (gleiche Aliquots) verwendet, um eine Aussage über deren Nachweisgrenze treffen zu können. Unmittelbar nach der Extraktion der RNA-Viren wurde die reverse Transkription durchgeführt.

#### Thermocyclerkonditionen

GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 2400 (USA, Wellesley)

**PCR:** 94°C 5 min. Denaturierung  
 40 Zyklen 94°C 30 sec. Denaturierung  
 55°C 30 sec. Anlagerung  
 72°C 30 sec. Polymerisierung  
 72°C 7 min. Polymerisierung

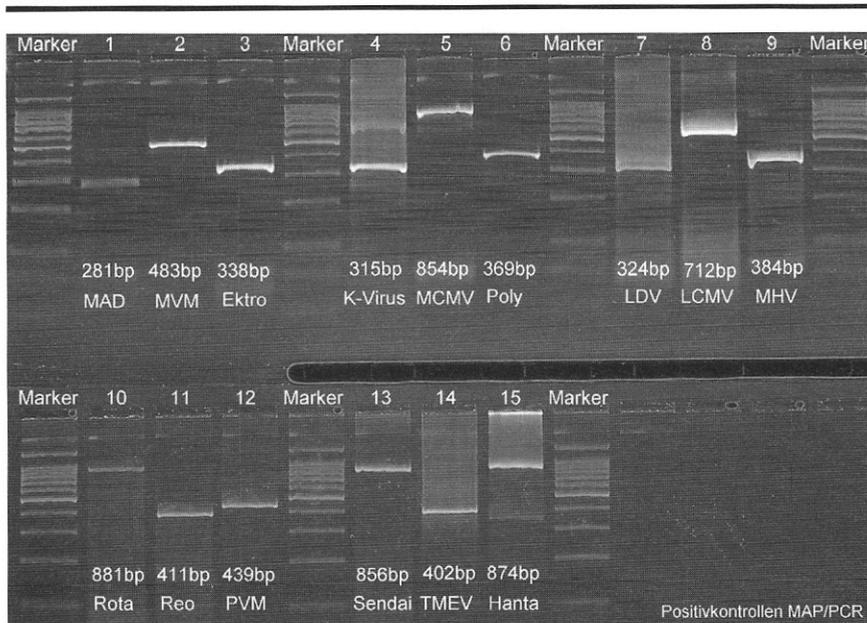
#### Gelelektrophorese

Das Probenmaterial wurde auf ein Clea-rose<sup>®</sup> BG-EtBr Mini Gel (*Elchrom*

*Scientific AG*, CH-Cham) aufgetragen und bei 120 Volt 25 Min. laufen gelassen. Als Puffer wurde 0,75-facher TAE-Puffer verwandt. 2 µl Probe wurden mit 3 µl 2,5-fachem Ladungspuffer gemischt und in die Slots des Gels aufgetragen. Als Marker zur Bestimmung der Basenlänge wurde ein 100 Basenpaar DNA-Marker (Catalys AG, CH-Wallisellen) mitgeführt. Das Ethidiumbromid wird an die DNA-Sequenz gebunden und fluoresziert unter dem Transiluminator. Danach wurde das Resultat mit einer Digitalkamera festgehalten und dokumentiert.

#### 2.9 TaqMan<sup>®</sup> Allgemein

Beim TaqMan<sup>®</sup> handelt sich um einen 96-well Thermocycler, der mit der gleichen Anzahl von 96 optischen Fibern verbunden ist. Laserlicht durchläuft diese Fiber und regt die Fluoreszenzfarbstoffe der TaqProbe<sup>®</sup> an. Die TaqProbe<sup>®</sup> (Tab. 6) ist ein zusätzliches Nukleotid (zwischen *Forward* und *Reverse Primer* angesiedelt) mit einem als Reporter bezeichneten Farbstoff. Im Falle einer Anlagerung der *Primer* und folgender Hybridisierung der Stränge wird der Reporter abgespalten und beginnt zu leuchten. Die Emission wird durch die Fiber zu einem Spektrographen, welcher an eine CCD Kamera angeschlossen ist, zurückgeleitet und alle 5 Sekunden gemessen. Eine Wellenlänge zwischen 500 und 660 nm kann mit dieser Methode



**Abb. 1:** Clearosegel mit den Fragmentgrößen der einzelnen durch die jeweiligen *Primer* amplifizierten PCR-Produkte

erfasst werden. Je mehr Virusmaterial vorhanden ist, desto stärker ist die gemessene Fluoreszenz, da vermehrt Reporterpartikel abgespalten werden.

**Thermocyclerkonditionen TaqMan®**  
 Diese Mixtur wurde in Optical Röhrchen pipettiert und im ABI Prism® 7700 Sequence Detector (TaqMan®) (Perkin-Elmer) analysiert.  
 50°C ⇒ 2 min. UNG-Aktivierung (Uracil-N-Glykosylase)

95°C ⇒ 10 min. Aktivierung der AmpliTaq® Gold DNA Polymerase  
 40 Zyklen 95°C ⇒ 15 sec. Denaturierung  
 60°C ⇒ 1 min. Polymerisierung

**Auswahl der TaqProbe® und Primer**  
 Mit der Software *Primer Express®* (Perkin Elmer) wurden *Primer* und *TaqProbe®* erarbeitet. *TaqProbe®* und *Primer* (Tab. 5) (Eurogentec, CH-

Geneve) wurden in der Genbank auf ihre Spezifität mit Hilfe der BLAST-Option (*Basic Local Alignment Search Tool*) untersucht.

**2.10 Tiere**

Die Mäuse, (NMRI, ♀, 8-10 Wochen alt, SPF (Felasa Richtlinien)) wurden von RCC (CH-4414 Füllinsdorf) bezogen. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen (Raumtemperatur 20°C, Luftfeuchtigkeit 50% +/- 5%, 12 h Hell-/Dunkelrhythmus) gehalten. Die Mäuse wurden jeweils zu zweit in statischen Typ 3 Filterkäfigen gehalten. Im Tierraum erfolgte ein 20-facher Luftwechsel/h. Es ist dabei von einem 5-fachen Luftwechsel/h im statischen Filterkäfig auszugehen (Keller et al., 1989). Die Käfige wurden vor dem Gebrauch komplett zusammengesetzt mit Einstreu (Rettenmaier & Söhne, D-Rosenberg; Lignocel 3-4 Fasern) und Futter (Nafag Ecosan, Provimi Kliba AG, CH-Gossau; DVOD 10 mm Mäuse-Ratten-Zuchtfutter) autoklaviert. Das Tränkewasser war mit 4 ppm Chlor behandelt. Die Umsetzung der Mäuse erfolgte wöchentlich unter einer Sterilbank, um jegliche Kontamination mit Erregern zu vermeiden.

**3 Ergebnisse**

Bei der Bestimmung der Nachweisgrenze von MAP-Test, konventioneller PCR und TaqMan® wurden die identischen Vi-

**Tab. 5:** Forward und Reverse Primer der realtime PCR (Taqman®)

Virus	Forward Primer 5'-3'	Reverse Primer 5'-3'
Mad FL	ACTCTGAGCGGTGTCCGC	GATGTGCATGAAGGCCACT
Reovirus 3	TGTGAGGTGGACGCGAATAG	CGTTGATGCAGCGTGAAGAG
Ektromelie	ATCCGGATACTACTGCGAATTTG	CCGTAACCAGAACCACACTTTG
MHV-3	ATACCTCGGGAACCATGGC	GAGATAAAACCAGTAACAGCGTGC
Polyoma	CGGCGTCTCTAAATGCGAG	AGCAGTTTGGGAACGGGTG
MCMV	CCGTCCAAAGAACCGTTCAA	GCTGGCTCAGGCGGTAAGT
PVM	GCAAGGACACTCGGCATGT	TGGAGCCCTATTTCTGCCAC
K-Virus	TGAGGGCTTAGGCCTTGGTT	ATTAGAGGCAGAGGAAGATGGCT
Sendai	GGGCGCATCTGTAGAAATC	CGGAAATCACGAGGGATGG
Rota	ACCGATGTTACGACCTTCGAA	CACGCCATCTACGACGTCC
LDV	AACCGCCTTTGTGGTGAGG	TTTGAAAGTCCGGACCAAC
TMEV	TGAGCTCTCTGAGGGCGAAC	GGACCTGAAGGGCTTGTITTT
LCMV	AAGCTCTGGACTGGAGCCAA	GAGAGCGGAGGTTAAGTTGCA
MVM	CAAGATGGTCAACTGAGCCCAA	TTCTCAACGGTCCGCAC

**Tab. 6: TaqProbe® der realtime PCR (TaqMan®).**

Virus	TaqProbe®	Amplikon
Mad FL	TGACGACGCCTTCAATGCAGCC	64 bp
Reovirus 3	CGGCCGGCTGGTGATCAGAGTATG	67 bp
Ektromelie	CAAACGGTTGCAGGCTATGTGTACCACAA	81 bp
MHV-3	CGCGGTGATGCAATGGCACC	66 bp
Polyoma	CAAAATGTACAAAGGCCTGTCCAAGACCC	69 bp
MCMV	CGTTCCTGGCGAAAACGCGC	67 bp
PVM	CTTACTTACTGCCTTCAACCGTTGCGAAGA	71 bp
K-Virus	TGCGACGTTGCTTTTGGACTGTGG	70 bp
Sendai	AGGCGTCGATGCGGTGTTCCAAC	67 bp
Rota	AAATTGCGACTGCGGAGAAATTAGCGATAA	72 bp
LDV	AGCCAGGTAGTACCCTTGTAACGGGC	68 bp
TMEV	CGCGTATGCTGGTCTGTCGC	71 bp
LCMV	TTTACCAACGACTCCATCCTTAATCACAAC	76 bp
MVM	GAGATCGAGGAGGATTTGAGAGCGTGCTT	80 bp

**Tab. 7: Stockviruskonzentration pro ml Virussuspension als Ausgangskonzentration der Verdünnungsstufen. Die Nachweisgrenzen für die Antikörperproduktion im Tier, die konventionelle PCR und der realtime PCR sind in den entsprechenden Spalten aufgeführt.**

Virus	Stockviruskonz./ml	AK-Prod.	PCR	TaqMan®
Mad FL	10(5,5) TCID50	10(-1)	10(-2,5)	10(-2,5)
MCMV	10(5,2) TCID50	10(1,2)	10(1,2)	10(-0,8)
Ektromelie	10(3,5) TCID50	10(-1,5)	10(-2,5)	10(-2,5)
K-Virus	2 HA-Einheiten	10(0)	10(-5)	10(-7)
MVM	10(4,5) TCID50	10(2)	10(0,5)	10(-2,5)
Polyoma	10(4,5) TCID50	10(-0,5)	10(-0,5)	10(-4,5)
LDV	10(10) ID50	10(2)	10(-2)	10(-2)
MHV-3	10(3) TCID50	10(-3)	10(-3)	10(-3)
PVM	32 HA-Einheiten	10(-2)	10(-4)	10(-4)
Reo 3	10(5,5) TCID50	10(1)	10(1)	10(0)
Sendai	10(2,5) TCID50	10(0,5)	10(-1,5)	10(-2,5)
TMEV	10(5,5) TCID50	10(1)	10(1)	10(0)
LCMV	10 (6) PFU	10(0)	10(0)	10(0)
Rota	10(3,5) TCID50	10(1,5)	10(-1,5)	10(-1,5)

**Tab. 8: Beispiel für die Nachweisgrenze des konventionellen PCR bei Sendai Virus.**

Zell-Linie, Erreger	Proben Nr.	Resultat
Sendai 10(1,5) TCID50/ml	1	pos.
Sendai 10(0,5) TCID50/ml	2	pos.
Sendai 10(-0,5) TCID50/ml	3	pos.
Sendai 10(-1,5) TCID50/ml	4	pos.
Sendai 10(-2,5) TCID50/ml	5	neg.
Tumor	6	neg.
PK, PCR.-Prod.	7	pos.
NK	8	neg.

rusverdünnungen (Aliquots) mit allen drei Methoden gemessen (Tab. 7).

Bei MHV-3 sind bis auf eine von zwei Mäusen der höchsten Verdünnungsstufe alle gestorben. Bei Ektromelie war der Sachverhalt ähnlich: Bis auf die zwei Mäuse der höchsten Verdünnungsstufe mussten die anderen aus Tierschutzgründen euthanasiert werden, da sich ihr Allgemeinbefinden drastisch verschlechterte. Die verstorbenen Tiere wurden im MAP-Test als positiv beurteilt.

Der TaqMan® war mindestens gleich sensitiv, meistens sensitiver als die konventionelle PCR. Die konventionelle PCR wies in den meisten Fällen höhere Verdünnungsstufen als der MAP-Test nach. Bei einigen Viren waren PCR und MAP-Test gleichwertig (MCMV, Polyoma, MHV-3, Reo 3, TMEV und LCMV). Bei zwei Viren waren alle drei Vergleichsmethoden gleich aussagekräftig (MHV-3 und LCMV).

Beispiel (Tab. 8, Abb. 2, 3):

PCR Sendai Virus  
Extraktion aus Tumorgewebe mit RNeasy® Mini Kit

Die PCR war bis zu einer Konzentration von 10(-1,5) TCID50/ml positiv. Eine Optimierung der Anlagerungstemperatur würde ein deutlicheres Bild geben. Es wurde darauf verzichtet, da wir ein Standardprogramm für alle 14 Viren erstellen wollten. Bei einzelnen Viren traten (Abb. 2) Zusatzbanden auf. Die für eine Sequenzierung ausreichend kräftigen Banden wurden isoliert, sequenziert und via Genbank identifiziert. Die Zusatzbande bei 430 bp weist eine 99%ige Homologie mit der Gensequenz ddIA für Allel 14 und 45 von *Streptococcus pneumoniae* auf. Die anderen Banden waren Teilfragmente humanen Gewebes.

Nachweisgrenze RT-PCR (Abb. 3):

10(-2,5) TCID50/ml

Nachweisgrenze konventionelle PCR (Abb. 2):

10(-1,5) TCID50/ml

Nachweisgrenze AK-Produktion:

10(0,5) TCID50/ml

#### 4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer molekularbiologischen

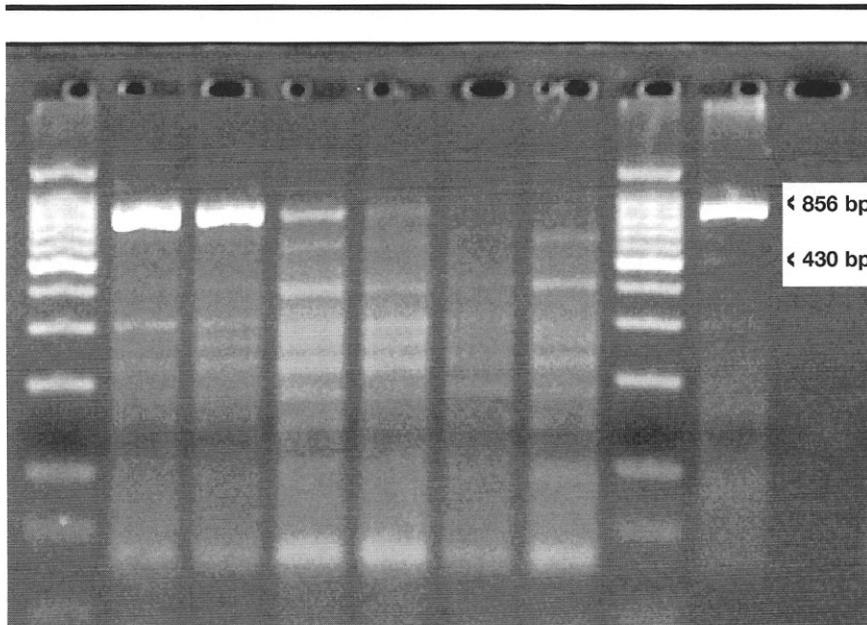


Abb. 2: Agarose-Gel, konventioneller PCR der einzelnen Verdünnungsstufen bei Sendai-Virus.

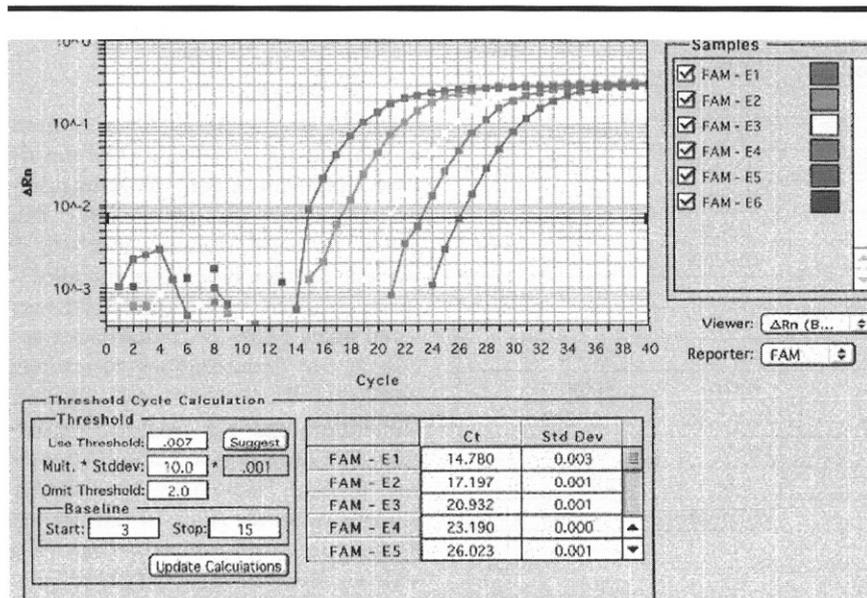


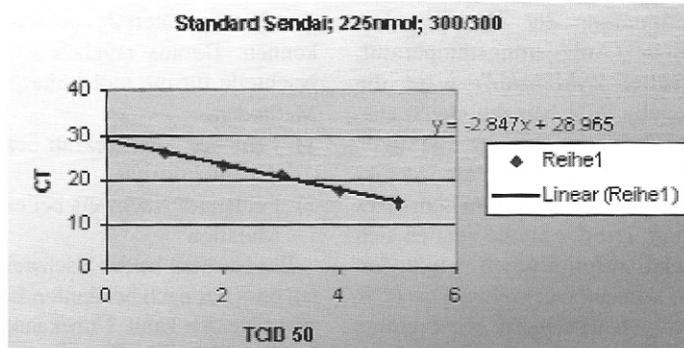
Abb. 3: Computerbild, *realtime* PCR (Taqman®) der einzelnen Verdünnungsstufen bei Sendai Virus.

Ersatzmethode für den Tierversuch MAP-Test. Um diesen ersetzen zu können, wurde ein Sensitivitätsvergleich zwischen MAP-Test und den molekularbiologischen Methoden PCR und *Realtime* PCR (TaqMan®) durchgeführt. Aus verschiedenen Gründen konnte nicht auf diesen Tierversuch verzichtet werden.

Um die Sensitivität der einzelnen Testmethoden, auf die einzelnen Viren bezogen, angeben zu können, musste ein identisches Untersuchungsmaterial sowohl für die serologischen als auch für die molekularbiologischen Nachweismethoden eingesetzt werden. Im Weiteren wurde in der Vergangenheit meist nur

ein begrenztes Erregerspektrum in den Geweben gefunden. In verschiedenen Studien wurden Transplantationstumore und Zelllinien auf mikrobielle Kontaminanten untersucht. Von Collins und Parker (1972) untersuchte Materialien waren zu 69% kontaminiert. Dabei zeigte sich, dass LDV mit 52% die häufigste Kontaminante war, gefolgt von MVM (32%), Polyoma (6%), MHV (4%), Sendai (3%), Lymphozytäres Choriomeningitisvirus (LCMV) (2%) und Reovirus (2%). Nicklas et al. (1993) haben in ihrer Studie ebenfalls LDV als häufigste Kontaminante nachgewiesen. Sie wiesen in absteigender Reihenfolge folgende weiteren Erreger nach, Reovirus 3, LCMV, MVM (*Minute virus of mice*), MHV, MCMV (Maus Cytomegalovirus) und *Mykoplasma pulmonis*. In der neuesten Studie von Nakai et al. (2000) war wiederum LDV die Kontaminante Nummer eins, gefolgt von Mykoplasmen und *Pasteurella pneumotropica*. Aus diesen Gründen wäre es nicht möglich gewesen, die Sensitivität der Nachweismethoden für alle in der Studie aufgeführten Erreger zu bestimmen.

Im direkten Vergleich aller früher angewandten Methoden (Zellkulturen, Babymastitration, u.a.) war der MAP-Test gleich sensitiv oder sensitiver und somit „golden standard“ für das Hygiene-Monitoring zu testender Proben. Schon bei Rowe et al. (1959) zeigte der MAP-Test ein gleich sensitives Ergebnis wie die Gewebekultur und war um einiges praktikabler. 1960 wurde das identische Resultat von Hartley und Rowe für das Mausadenovirus beschrieben. Auch der MAP-Test des Sendai Virus war in der Aussagekraft gleichwertig mit der Virusisolierung (Parker, 1968). 1971 wurden von Vester et al. LCMV, TMEV und Reovirus 3 überprüft. Man verglich in dieser Studie den MAP-Test mit der Virustitration in Babymäusen. Bei LCMV und Reovirus 3 waren die beiden Methoden vergleichbar. Hingegen war die Titration in Babymäusen bei TMEV sensitiver gegenüber dem MAP-Test. 1989 wurde von de Souza et al. ein Vergleich zwischen MAP-Test und direkter Virusisolierung aus Zellkulturen durchgeführt. Wie schon bei Vesters (1971) war bei LCMV und Reo 3 der MAP-Test die sensitivere Methode. Für MHV war



CT	Konzentrationen	
E1	:14,78	1 :10 (-2,5)
E2	:17,20	2 :10 (-1,5)
E3	:20,93	3 :10 (-0,5)
E4	:23,19	4 :10 (0,5)
E6	:26,02	6 :10 (1,5)

Abb. 4: Standardkurve Sendai Virus

der MAP-Test sogar um das 1000-fache sensitiver. Bei MVM standen sich die beiden Methoden in nichts nach. In dieser Studie überprüfte de Souza gleichzeitig den Unterschied zwischen *i.p.* (*intraperitoneal*) und *i.s.* (*intrasplenal*) Applikation des Probenmaterials im MAP-Test. Er kam zu dem Ergebnis, dass die beiden Verfahren identische AK-Produktionen provozierten.

Bezüglich des AK-Nachweises ist festzustellen, dass die Antigenaufbereitung für die verschiedenen Testmethoden (ELISA=*enzyme-linked-immunosorbent-assay*; HAH=*Hämagglutinationshemmtest*; IFA=*Indirekter Immunfluoreszenzassay* u. a.) sehr entscheidend ist (Schmidt, 1971). 1986 konnte Kraft zeigen, dass der AK-Nachweis von Sendai Virus, PVM, TMEV, MVM und Reovirus 3 um 30% höher lag, wenn anstelle des HAH-Testes der ELISA oder IFA verwandt wurde. Es konnte ebenfalls demonstriert werden, dass der AK-Titer beim ELISA 20-mal höher lag als beim HAH-Test. Im Weiteren zeichneten sich ELISA und IFA durch sehr geringe unspezifische und wenig falsch-positive Ergebnisse aus. Die hohe Sensitivität des IFA konnte auch in einer Arbeit von Besselsen (2000) bestätigt werden. Er wies in dieser Studie das Mausparvovirus

1 nach. Aus diesem Grunde wurden in unserer Arbeit die AK-Titer mittels IFT nachgewiesen. Ausnahmen bildeten das K-Virus und LDV. Das K-Virus kann nicht in Zellkulturen angezüchtet werden und wurde mittels HAH-Test nachgewiesen. Auch LDV wird in Mäusen vermehrt und wurde über einen Enzymanstieg der Laktatdehydrogenase detektiert.

Als Ersatzmethode für den MAP-Test wurde die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) bezüglich ihrer Aussagekraft verglichen. Bei der PCR wird die virale RNA/DNA nachgewiesen. Eine genau definierte Gensequenz wird mit Hilfe der *Primer* begrenzt und amplifiziert. Es handelt sich bei der PCR um eine sehr sensitive und, in Abhängigkeit der *Primerauswahl*, sehr spezifische Methode. In einer Studie von Yamada (1993) wurde ein Vergleich zwischen PCR und MAP-Test bezüglich des MHV-JHM vorgenommen. Für die PCR ergab sich ein Sensitivitätsnachweis bis zu 10(-3) PFU (*Plaque Forming Units*), wogegen der MAP-Test nur 30 PFU nachweisen konnte. Auch in unserer Arbeit war der PCR-Nachweis für MHV-3 äusserst sensitiv (10(-3) TCID50/ml). Im Gegensatz zu Yamadas Studie wurde in unserem Fall der MAP-Test gleich sensitiv wie die PCR bewertet. Diese über-

zeugend hohe Sensitivität lag an der Auswahl des Virus- und Mausstammes. MHV-3 ist extrem pathogen, und der verwendete NMRI-Stamm ist nicht resistent. So genügte eine geringe Virusmenge zur Auslösung eines hepatotoxisch bedingten Todes, welcher in unserem Falle als positiver MAP-Test interpretiert wurde. Ob diese geringe Virusmenge ausgereicht hätte, eine Immunreaktion auszulösen, bleibt fraglich. Nach der Studie von Yamada scheint dieser Verlauf eher unwahrscheinlich, und der indirekte Virusnachweis mittels AK-Messung wäre vermutlich nicht so sensitiv gewesen. Schon 1991 wurde von Homberger et al. der MHV-Nachweis mittels PCR, MAP-Test und Babymastitration verglichen. Auch bei dieser Studie war die PCR äusserst sensitiv. Die Babymastitration war in ihrer Sensitivität geringer und der MAP-Test gleich sensitiv. 1997 entwickelte Park einen PCR-Nachweis für LCMV und konnte das Virus bis zu einer Konzentration <1TCID50/ml nachweisen. In unserer Arbeit war die Detektionsgrenze für LCMV auch bei 10(0) TCID50/ml.

Die Nachweisgrenze des TaqMan® war mit derjenigen der konventionellen PCR vergleichbar. Der aussagekräftige Nachweis mittels TaqMan® wurde 1996 von Morris für das Hepatitis C Virus dargestellt. Bei der *Realtime* Technologie des TaqMan® handelt es sich um eine PCR, bei welcher die Amplifikatmenge permanent photoelektrisch gemessen wird. Dieser Vorgang erlaubt es, eine quantitative Aussage über das Ausgangsmaterial treffen zu können.

Um einen Vergleich der Methoden zu erzielen, wurde das Virusmaterial angezüchtet und später in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Bei der Aufbereitung des Probenmaterials wurden die verschiedenen Viruskonzentrationen absichtlich zuerst mit Tumorgewebe versetzt und später extrahiert. Bei einer Umkehrung der Reihenfolge in Extraktion und folgender Verdünnung des Extraktes wäre die Ausbeute an viraler DNA oder RNA grösser gewesen, da der Extraktionsvorgang mit einem Verlust der Ausbeute einhergeht. Dieser Vorgang hätte die natürlichen Bedingungen nicht wiedergespiegelt. Das Tumorgewebe wurde bewusst beigegeben, um eventuell

auftretende Störfaktoren, bedingt durch die zusätzliche Tumor-DNA, zu testen. Bei vier Viren traten tatsächlich interferierende Banden auf (MCMV, Polyoma, Sendai und PVM). Um eine Interpretation dieser Zusatzbanden zu ermöglichen, wurden sie mit GenElute™ Gel Purification Kit (SIGMA) extrahiert und bei Microsynth sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte sowohl vom 3'- als auch vom 5' Ende. Die resultierenden Sequenzen wurden in der Genbank mit dokumentierten Sequenzen verglichen. In drei Fällen konnte keine Homologie mit anderen Sequenzen nachgewiesen werden. Beim Sendaivirus war eine 99%ige Homologie mit Gensequenzen von *Streptococcus pneumoniae* zu beobachten. In allen vier Fällen sind die Zusatzbanden auf das Tumormaterial zurückzuführen. Im Fall von Sendai handelt es sich vermutlich um eine Kontamination des Tumorgewebes mit *S. pneumoniae*. Die Vermutung, dass es sich um mutiertes Virusmaterial handeln könnte, hat sich nicht bestätigt. In den anderen drei Fällen handelt es sich dabei höchstwahrscheinlich um die Amplifizierung einer tumorspezifischen Sequenz, welche mit den ausgewählten *Primern* hybridisiert. Die *Primer* wurden zwar auf ihre Spezifität bei der Genbank überprüft, aber nicht alle Zelllinien sind genetisch erfasst. So kann es problemlos zu solch einer ungewollten Amplifikation kommen. In dieser Arbeit wurden 2 Läufe pro Virus mit dem TaqMan® durchgeführt und eine Standardkurve (Abb. 4) erstellt. Es gilt dabei zu beachten, dass diese geringen Wiederholungsläufe nicht ausreichend sind für eine Quantifizierung der Standardkurven. Zur Erlangung einer extrem geringen Standardabweichung, müssten mehrere Läufe mit den verschiedenen Konzentrationen überprüft werden. In dieser Studie wurden die Standardgeraden nur exemplarisch dargestellt und nicht als übertragbare Quantifizierungstabelle. Dass die Nachweisgrenze beim TaqMan® teilweise höher lag als bei der konventionellen PCR, ist auf zwei Tatsachen zurückzuführen. Bei der konventionellen PCR waren die Anlagerungstemperaturen für die *Primer* (Standardisierung) teilweise nicht optimal. Daher war die Amplifi-

kationsrate ebenfalls suboptimal. Bei einer Optimierung der Thermocyclerkonditionen (Anlagerungstemperatur, Zeitintervalle, Zyklenzahl) wäre die konventionelle PCR beinahe gleich aussagekräftig gewesen wie der TaqMan®. Im Weiteren bildet die Fluoreszenzdetektion des TaqMan® ein extrem sensitives Messsystem. Bei der Studie zeigten sich die molekularbiologischen Methoden insgesamt sehr aussagekräftig. Die PCR war gleich sensitiv, meist sogar einige Stufen sensitiver als der MAP-Test. Daraus ergeben sich mehrere Vorteile.

- 1) Der Tierversuch kann eingeschränkt werden.
- 2) Das Ergebnis liegt nach einer kurzen Zeitspanne (1-2 Tage) vor.
- 3) Durch die fehlende Virusvermehrung im Tier ist die Kontaminationsgefahr minimiert.
- 4) Unabhängigkeit von der Immunlage der Maus

Ein Nachteil der molekularbiologischen Methoden ist die fehlende Aussagekraft bezüglich der Vitalität des Virusmaterials. Die PCR weist sowohl infektiöses als auch nicht mehr vermehrungsfähiges Virus nach. Es gilt zu beachten, dass bei den serologischen Methoden ein beachtlicher Teil falsch-positiver Ergebnisse vorkommt. Gerade bei dem K-Virus, welches nur mittels HAH-Test nachgewiesen werden kann, ist dieses Risiko sehr hoch. Unter natürlichen Bedingungen kann keine Aussage über die Infektiosität getroffen werden. Da aus hygienischer Sicht jeglicher früherer Kontakt mit Kontaminanten ausgeschlossen werden soll, ist ein virusfreies Material erwünscht. Zusätzlich ist darauf hinzuweisen, dass es sich bei Viren um mutationsfähige Erreger handelt. Aufgrund dieser Tatsache könnte eine mutationsbedingte fehlende Anlagerung der *Primer* resultieren. Da bei der Auswahl der *Primer* die ganze Virusfamilie abgedeckt wurde und nicht nur ein einzelner Stamm, ist dieser Vorgang sehr unwahrscheinlich. Sicherheitshalber sollten die entsprechenden Datenbanken periodisch nach Sequenzen neuer Subtypen durchsucht werden. Daraufhin muss ein *Alignment* des entsprechenden Sequenzbereiches und den virusspezifischen *Primern* durchgeführt werden,

um eine falsch-negative Beurteilung des Probenmaterials ausschliessen zu können. Daraus ergeben sich mehrere Nachteile für die molekularbiologischen Methoden.

- 1) Fehlende Aussagekraft bezüglich der Infektiosität
- 2) Fehlender Nachweis bei einer Mutation

Ein Nachteil beider Nachweismethoden ist, dass nur nach bekannten Erregern gesucht werden kann. Unbekannte und/oder humanpathogene Erreger, für die auch die Labornager empfänglich sind und entsprechend mit Erkrankung oder Tod reagieren, bleiben unentdeckt. In diesen Fällen können beim MAP-Test lediglich zusätzliche histologische Untersuchungen und im Falle der molekularbiologischen Tests allgemeingehaltene PCR mit anschließender Sequenzierung ein weiterführendes Ergebnis erbringen. Ob diese Methodik grundsätzlich zum Nachweis nicht routinemässig erfasster Erreger führt sei dahingestellt.

Diese Studie hat zweifellos die molekularbiologischen Nachweismöglichkeiten als Ersatzmethoden für den MAP-Test in Aussicht gestellt. Sie waren in dieser Arbeit äusserst überzeugend, und die Vorteile überwiegen eindeutig die Nachteile. Um eine Bestätigung dieser Ergebnisse und eine vollständige Validierung zu erlangen, müsste künftig eine grössere Anzahl an Tumorklinen, Transplantaten u. a. sowohl mit Hilfe des MAP-Testes als auch mit Hilfe der PCR auf murine Viren untersucht und verglichen werden. An unserem Institut wurden in den letzten 3 Jahren über 50 Gewebeproben mittels PCR getestet. Die Ergebnisse wurden durch eine permanente Kontrolle der entsprechenden Tierhaltungen begleitet. Bei allen serologischen Nachuntersuchungen (IFA) wurden die PCR Ergebnisse bestätigt. Die molekular-biologischen Methoden haben gezeigt, dass sie in Zukunft in der Lage sein werden, in vielen Bereichen den Tierversuch zu ersetzen.

## Literatur

Barthold, S. W., Beck, D. S. and Smith, A. L. (1993). Enterotropic coronavirus

- (mouse hepatitis virus) in mice: influence of host age and strain on infection and disease. *Laboratory Animal Science* 43(4), 276-284.
- Besselsen, D. G., Wagner, A. M. and Loganbill, J. K. (2000). Effect of mouse strain and age on detection of mouse parvovirus 1 by use of serologic testing and polymerase chain reaction analysis. *Comparative Medicine* 50(5), 498-502.
- Chin, H., Welsh, T. et al. (1996). Distinct organ-dependent mechanisms for the control of murine cytomegalovirus infection by natural killer cells. *Virology* 71(1), 267-275.
- Collins, M. J. and J. C. Parker (1972). Murine virus contaminants of leukemia viruses and transplantable tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 49, 1139-1143.
- Corbett, T. H., D. P. Griswold, Jr., Roberts, B. J. et al. (1975). Tumor induction relationships in development of transplantable cancers of the colon in mice for chemotherapy assays, with a note on carcinogen structure. *Cancer Research* 3, 2434-2439.
- de Souza, M. and Smith, A. L. (1989). Comparison of isolation in cell culture with conventional and modified mouse antibody production tests for detection of murine viruses. *J. Clin. Microbiol.* 27, 185-187.
- Delenda, C., Hausmann, S., Garcin, D. et al. (1996). Normal cellular replication of sendai virus without the transframe, nonstructural V protein. *Virology* 228, 55-62.
- Dempsey, W. J., Smith, A. L., Morahan, P. S. et al. (1986). Effect of inapparent murine hepatitis virus infections on macrophages and host resistance. *J. Leukocyte Biol.* 39, 559-565.
- Engers, H. D., Louis, J. A., Zubler, R. H. and Hirt, B. (1981). Inhibition of T cell-mediated functions by MVM(i), a parvovirus closely related to the minute virus of mice. *J. Immunol.* 127, 2280-2285.
- Fenner, F. and Wallace, P. (1990). Poxviruses of laboratory animals. *Laboratory Animal Science* 40(5), 469-480.
- Fotiadis, C., Kilpatrick, D. R. and Lipton, H. L. (1991). Comparison of the binding characteristics to BHK-21 cells of viruses representing the two theiler's virus neurovirulence groups. *Virology* 182, 365-370.
- Greenlee, J. E., Clawson, S. H., Phelps, R. C. and Stroop, W. G. (1994). Distribution of K-papovavirus in infected newborn mice. *J. Comp. Pathol.* 111(3), 259-268.
- Guida, J. D., Fejer, G., Pirofski, L. A. et al. (1995). Mouse adenovirus 1 causes a fatal hemorrhagic encephalomyelitis in adult C57BL/6 but not BALB/c mice. *Journal of Virology* 69(12), 7674-7681.
- Hartley, J. W. and Rowe, W. P. (1960). A new mouse virus apparently related to the adenovirus group. *Virology* 11, 645-647.
- Hashimoto, K., Sugiyama, T. and Sasaki, S. (1966). An adenovirus isolated from the feces of mice. *JPN. J. Microbiol.* 10, 115-125.
- Hayashi, T., Mori, I., Noguchi, Y. et al. (1992). Immunofluorescent antibody response to lactic dehydrogenase virus in different strains of mice. *J. Comp. Path.* 107, 179-183.
- Hernando, E., Llamas-Saiz, A. L., Foces-Foces, C. et al. (2000). Biochemical and physical characterization of parvovirus minute virus of mice virus-like particles. *Virology* 267, 299-309.
- Homberger, F. R., Smith, A. L. and Barthold, S. W. (1991). Detection of rodent coronaviruses in tissues and cell cultures by using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2789-2793.
- Horsfall, F. L. and Curnan, E. C. (1946). Studies on pneumonia virus of mice (PVM) II. Immunological evidence of latent infection with the virus in numerous mammalian species. *J. Exp. Med.* 83, 43-64.
- Isakov, N., Feldmann, M. and Segal, S. (1981). Effect of lactic dehydrogenase virus infection on tumor induction and tumor growth. *Cancer Res.* 41, 667-672.
- Jacoby, R. O., Ball-Goodrich, L. J., Besselsen, D. K. et al. (1996). Rodent parvovirus infections. *Laboratory Animal Science* 46, 370-380.
- Keller, L. S., White, W. J., Snider, M. T. and Lang, C. M. (1989). An evaluation of intra-cage ventilation in three animal caging systems. *Laboratory Animal Science* 39(3), 237-242.
- Kirk, W. E., Cash, P., Peters, C. J. and Bishop, D. H. (1980). Formation and characterization of an intertypic lymphocytic choriomeningitis recombinant virus. *Gen. Virol.* 51, 213-218.
- Kraft, V. and Meyer, B. (1986). Diagnosis of murine infections in relation to test methods employed. *Laboratory Animal Science* 36(3), 271-276.
- Kyriazis, A. P., DiPersio, L., Michael, J. G. and Pesce, A. J. (1979). Influence of the mouse hepatitis virus (MHV) infection on the growth of human tumors in the athymic mouse. *Int. J. Cancer* 23, 402-409.
- Levy, G. A., Leibowitz, J. L. and Edgington, T. S. (1981). Induction of monocyte procoagulant activity by murine hepatitis virus type 3 parallels disease susceptibility in mice. *J. Exp. Med.* 154(4), 1150-1163.
- McWilliam, A. S., Marsh, A. M. and Hold, P. G. (1997). Inflammatory infiltration of the upper airway epithelium during sendai virus infection: involvement of epithelial dendritic cells. *Journal of Virology* 71(1), 226-236.
- Mori, T., Nakamura, M., Shimizu, K. et al. (1999). In vivo disturbance of hematopoiesis in mice persistently infected with murine cytomegalovirus: impairment of stromal cell function. *Virology* 253(2), 145-154.
- Morris, T., Robertson, B., Gallagher, M. et al. (1996). Rapid reverse transcription-PCR detection of hepatitis C virus RNA in serum by using the TaqMan fluorogenic detection system. *Journal of Clinical Microbiology* 34(12), 2933-2936.
- Nakai, N., Kawaguchi, C., Nava, K. et al. (2000). Detection and elimination of contaminating microorganisms in transplantable tumors and cell lines. *Exp. Anim.* 49(4), 309-313.
- Neubauer, E., Pfeffer, M. and Meyer, H. (1996). Specific detection of mousepox virus by polymerase chain reaction. *Laboratory Animals* 31, 201-205.
- Nicklas, W., Kraft, V. and Meyer, H. (1993). Contamination of transplantable tumors, cell lines, and monoclonal antibodies with rodent viruses. *Laboratory Animal Science* 43(4),

- 296-300.
- Park, J. Y., Peters, C. J., Rollin, P. E. et al. (1997). Development of a reverse transcription-polymerase chain reaction assay for diagnosis of lymphocytic choriomeningitis virus infection and its use in a prospective surveillance study. *Journal of Medical Virology* 51, 107-114.
- Parker, G. C. and Richter, C. B. (1982). Viral diseases of the respiratory system. In H. L. Foster and J. G. Fox (eds.), *The Mouse Biomedical Research (109-158)*. New York 2: Academic Press.
- Parker, J. C. and Reynolds, R. K. (1968). Natural history of Sendai virus infection in mice. *Am. J. Epidem.* 88, 112-125.
- Popovic, D. (1998). Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als Ersatz für den Mäuse- und Ratten-Antikörper-Produktionstest (MAP- und RAP-Test). Dissertation.
- Richter, C. B., Thigpen, J. E., Richter C. S. and Mackenzie, J. M. (1988). Fatal pneumonia with terminal emaciation in nude mice caused by pneumonia virus of mice. *Laboratory Animal Science* 38(3), 255-261.
- Rowe, W. P., Hartley, J. W., Estes, J. D. and Huebner, R. J. (1959). Studies of mouse polyoma virus infection. 1. Procedures for quantitation and detection of virus. *J. Exp. Med.* 109, 379-391.
- Russel, W. M. S. and Burch, R. L. (1959). *The principles of human experimental technique*. London: Methuen Press.
- Schmidt, N. J. and Lennette, E. H. (1971). Comparison of various methods for preparation of viral serological antigens from infected cell cultures. *Applied Microbiology* 21(2), 217-226.
- Sermiswan, R. W., Wongratanacheewin, S., Anuntagool, N. and Sirisinha, S. (2000). Comparison of the polymerase chain reaction and serologic tests for diagnosis of septicemic melioidosis. *Am J Trop Med Hyg* 63(3-4), 146-149.
- Tattersall, P. and Cotmore, S. F. (1986). The rodent parvoviruses. *Academic Press INC*, 305-348.
- Tischhauser, M. E. (1999). Replacement of mouse and rat antibody production (MAP/RAP) test by polymerase chain reaction. Dissertation.
- van den Broek, M. F., Spörri, R., Even, C. et al. (1997). Lactate dehydrogenase-elevating virus: lifelong coexistence of virus and LDV-specific immunity. *Journal of Immunology* 159, 1585-1588.
- Van Hoosier, G. L. and Robinette, L. R. (1976). Viral and chlamydial diseases. In J. E. Wagner and P. Manning (eds.), *The Biology of the Guinea Pig (137-150)*. New York: Academic Press.
- Vester, J. L. and Clayton, D. M. (1971). An evaluation of the mouse antibody production test for detecting three murine viruses. *Laboratory Animal Science* 21(2), 203-205.
- Yamada, Y. K., Yabe, M., Yamada, A. and Taguchi, F. (1993). Detection of mouse hepatitis virus by the polymerase chain reaction and its application to the rapid diagnosis of infection. *Laboratory Animal Science* 43(4), 285-290.

#### Fördermittel/Danksagung

Bedanken möchten wir uns recht herzlich bei der Stiftung Forschung 3R (CH-Münsingen) für die grosszügige finanzielle Unterstützung dieser Arbeit und bei PD Dr. Mark Suter, Institut für Veterinärvirologie der Universität Zürich, für die allzeit gewährte fachliche Betreuung.

#### Korrespondenzadresse

Dr. Frank Bootz  
 Institut für Labortierkunde  
 Universität Zürich  
 Winterthurerstrasse 190  
 CH-8057 Zürich  
 E-mail: fobo@ltk.unizh.ch